

令和元年5月22日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11491

研究課題名(和文)顎顔面部神経障害性疼痛制御に向けた2光子励起顕微鏡による島皮質の解析

研究課題名(英文) Investigation regarding neuropathic orofacial pain using two-photon microscopy in the insular cortex

研究代表者

藤田 智史 (FUJITA, Satoshi)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：00386096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害はしばしばアロディニア(触刺激、温度刺激でも痛みと感ずる症状)等を誘発する。本研究では下歯槽神経切断モデルにおいて、主に侵害受容情報を中枢に伝える歯髄に刺激を行い、島皮質の応答を検討した。広い視野で神経活動を観察する膜電位感受性色素を用いた光学計測法では、興奮伝播の増大が観察された。個々のニューロンの活動性を記録できる2光子励起顕微鏡によるカルシウム・イメージング法では、興奮性だけでなく抑制性ニューロンの応答性が増強していることが観察された。これらのことから、侵害受容情報処理をする神経回路に可塑的な変化が誘発されていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害はアロディニアや痛覚過敏等を誘発することが知られている。本研究では、下歯槽神経切断モデルでは疼痛の処理に関わる島皮質で、侵害刺激を受けた時の興奮伝播が、実際に増大していることが明らかとなった。また、その根底にあるメカニズムとして、単に大脳皮質で興奮性ニューロンの活動性が上がっているだけでなく、神経活動を抑制するはずの抑制性ニューロンの活動性も上がっていることが観察された。これらのことは、神経活動を抑制する機構を含めて何らかの可塑的な変化が島皮質を含む大脳皮質の局所回路で起こっていることを示しており、今後、治療ターゲット候補となる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Nerve injury could be causing neuropathic pain, such as allodynia and hyperalgesia. In this study, we examined the insular cortex in an inferior alveolar nerve transection animal model and observed responses to electrical stimulation of the dental pulps which primarily transmit nociceptive information to the central nervous system. Optical imaging with a voltage-sensitive dye in the insular cortex revealed enhanced excitatory propagation at the macroscopic level. At the cellular level, calcium imaging using two-photon microscopy revealed enhanced responses in not only excitatory neurons but also inhibitory neurons. These results suggest that plastic changes of the local circuits of the cerebral cortex including the insular cortex might contribute to the enhancement.

研究分野：神経科学

キーワード：2光子励起顕微鏡 カルシウム・イメージング 侵害刺激 下歯槽神経切断モデル 光学計測法 膜電位感受性色素 異所性疼痛

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛では、侵害受容神経の異常な興奮状態が継続し、軽い接触や温度刺激で痛みを感じる状態のアロディニア（異痛症）や痛覚過敏等の症状を呈し、危険を回避するという、痛みの本来の意義からは大きく外れた状態となる。しばしば難治性となり、そのようなケースでは日常生活で絶えず誘発される痛みによる苦痛が重積し、著しい Quality of Life (QOL) の低下を招く。神経障害性疼痛の治療として、薬物をはじめ、幅広い治療方法が試みられているが、十分な除痛・鎮痛効果が得られないことも多く、治療方法確立のためにも、神経障害性疼痛の病態解明が求められている。また、近年、新しい治療方法としてニューロモデュレーション療法が臨床応用され除痛効果が確認されてきているが、メカニズムはほとんど解明されておらず適応が限られている。そこで、本研究では、(1)神経障害性疼痛は侵害受容情報を処理する島皮質領域にどのような影響をもたらしているのか、(2)温度感覚を受容した時に、その情報は脳皮質のどの領域において処理されているのか、(3)ニューロモデュレーション療法は神経障害性疼痛モデルにおいて脳皮質の情報処理を変化させるのかを検討した。

2. 研究の目的

(1)神経障害性疼痛モデルにおける島皮質の侵害受容情報処理

ラットでは三叉神経から分かれる下顎神経の枝の下歯槽神経を切断すると、支配領域の麻痺だけでなく、上顎神経の支配領域となる口髭部皮膚に異所性のアロディニアが発症することが行動学的検討等から知られている。本研究では、神経障害によって発症する異常疼痛に脳皮質がどのように関与するのかを明らかにする目的で、異所性疼痛を誘発する下歯槽神経切断モデル (IANX) を作製し、最終的に侵害受容情報処理を行う脳皮質において侵害刺激に対する応答性がどのように変化しているのかを検討した。

(2)温度感覚に関わる情報処理部位の検索

神経障害は普通であれば冷たいと感じるような刺激に対して痛いと感じるようなアロディニアを誘発することが知られている。温度感覚情報を処理する脳部位として、positron emission tomography (PET)、fMRI を用いた検討から島皮質が候補に挙がっている (Craig et al., 2000; Olausson et al., 2005; Guest et al., 2007) が、不明な点が多い。そこで、顎顔面領域に温度刺激を行った際の体性感覚野、島皮質の応答性を検討した。

(3)ニューロモデュレーション療法による疼痛緩和時の脳皮質応答性

ニューロモデュレーション療法による電気刺激は中断してもしばらくその効果が持続することから、神経活動の可塑的变化が推測されている。そこで、神経障害性疼痛モデルを作製し、ニューロモデュレーション療法を行い、末梢の刺激に対する脳皮質の応答性が変化するか否かを検討した。

3. 研究の方法

(1)神経障害性疼痛モデルにおける島皮質の侵害受容情報処理

全身麻酔下で下歯槽神経を切断したラットを IANX 群、下歯槽神経を露出させただけのラットを Sham 群とした。手術後、IANX 群では 1 週間後、2 週間後、4 週間後、Sham 群では 1 週間後と 4 週間後に島皮質と体性感覚野を含む領域を全身麻酔下で開窓し、膜電位感受性色素を負荷後、光学計測システム (Brainvision 社製、東京) を用いて、応答を記録した。歯髄は主に侵害受容情報を伝達する A 線維と C 線維で構成されている。これに着目し、本研究ではより純粋な侵害受容刺激となる上顎臼歯歯髄電気刺激を行い、脳皮質の応答性を検討した。

後述するように IANX 群では 1 週間後に著明な応答の増大が認められ、その根底にあるニューロン活動を解明する目的で、1 週間後に着目して続く検討を行った。実験には興奮性、抑制性ニューロンを区別するため、抑制性ニューロンに Venus 蛍光タンパクを発現した遺伝子改変動物となる VGAT-Venus ラットを用いた。2 光子励起顕微鏡によるカルシウム・イメージング法による個々の興奮性、抑制性ニューロンが上顎臼歯歯髄刺激に対して示す応答を記録した。

(2)温度感覚に関わる情報処理部位の検索

温度刺激に応答する部位を検索する目的で、興奮性ニューロンにカルシウム感受性タンパクの GCaMP6s を発現した遺伝子改変マウスにウレタン麻酔を行い、舌に温度プローブによる刺激を行い、実体顕微鏡に設置した CCD カメラを用いて広い視野で応答を観察した。また、舌に電気刺激を行い島皮質で応答が認められた領域において、舌に温度プローブによる刺激を行った時のニューロン活動を 2 光子励起顕微鏡によるカルシウム・イメージング法により記録した。

鼻腔粘膜が空気の流れを感受する際に、温度は重要な役割を果たすことが報告されている (Tsubone, 1989)。そこで圧搾した空気をラットの鼻腔内に吹き付けた時の皮質応答を、膜電位感受性色素を使った光学計測法で記録した。また、TRPM8 受容体を活性化することで冷感覚を誘発する *l*-menthol を加えた空気による刺激を鼻腔内に行い皮質応答の変化を検討した。

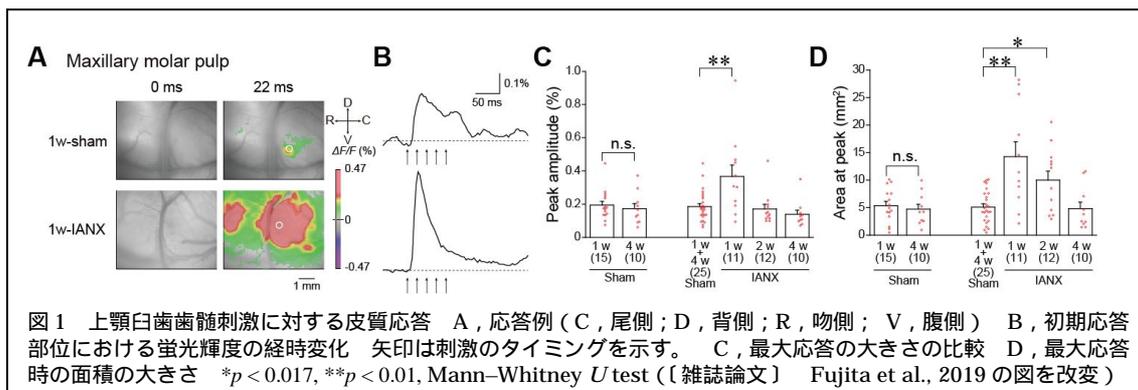
(3)ニューロモデュレーション療法による疼痛緩和時の脳皮質応答性

後肢を刺激した時の体性感覚野の応答が、脊椎に沿わせて挿入した電極を介してニューロモ

デュレーションを行うことで変調するかを検討した。神経障害性疼痛モデルとして坐骨神経損傷モデルを作製し、電極を挿入したがニューロモデュレーション療法を行わなかった (Sham) 群を対照として、電気刺激を行ったニューロモデュレーション群と比較した。ラットの後肢に電気刺激を行い一次体性感覚野における反応を、膜電位感受性色素による光学計測法によって空時間的に記録した。

4. 研究成果

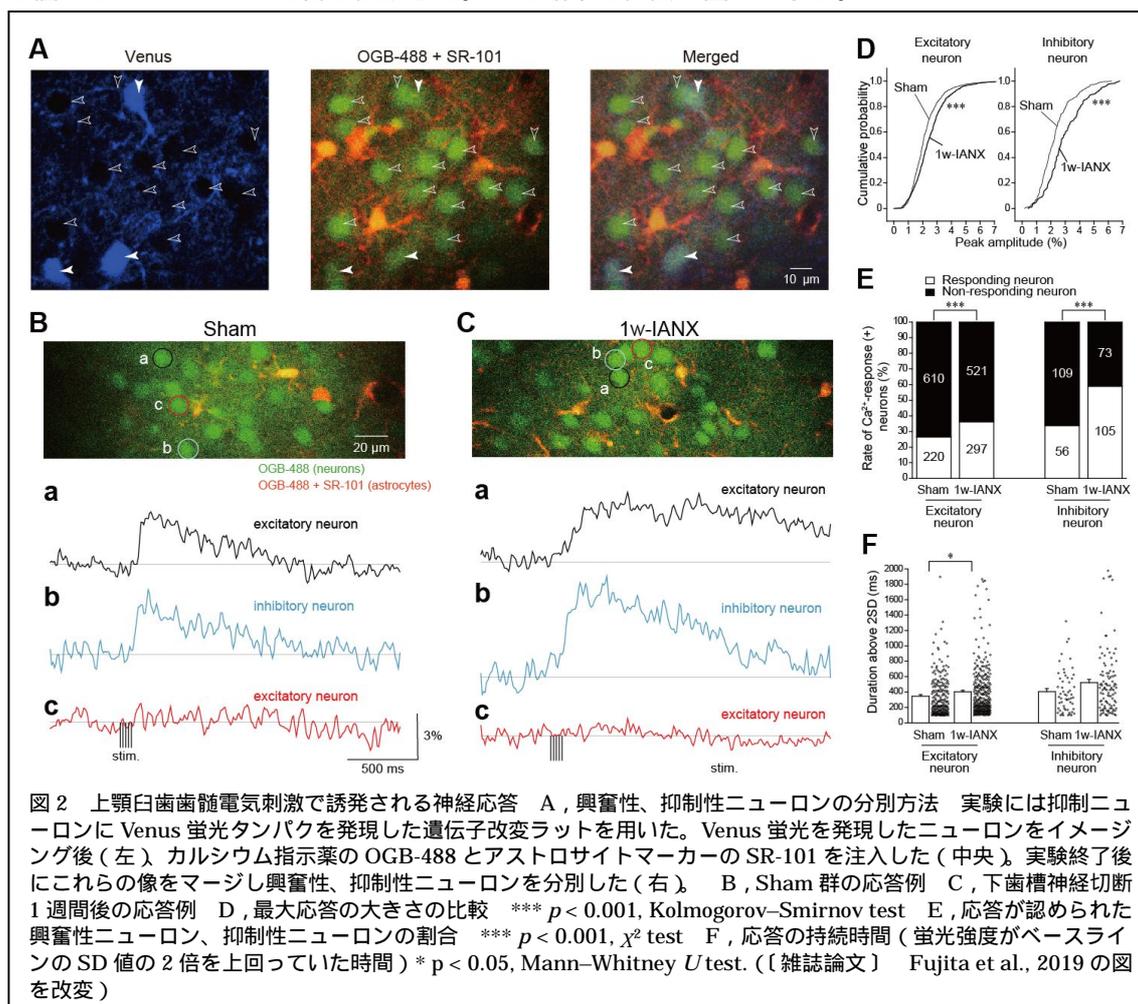
(1) 神経障害性疼痛モデルにおける島皮質の侵害受容情報処理機構
膜電位感受性色素を用いた光学計測法の結果
結果の概要を図 1 に示す。



下歯槽神経切断から 1 週間後では上顎臼歯髄刺激に対する大脳皮質の応答が増大していた。また、応答面積の増大は切断後 2 週間まで継続していた。これらのことから、下歯槽神経切断は、侵害刺激に対する大脳皮質の応答性を増大させることが示された。

2 光子励起顕微鏡を用いたカルシウム・イメージング法の結果

膜電位感受性色素を用いた光学計測法では個々のニューロン活動の実体が不明なままである。そこで、2 光子励起顕微鏡によるカルシウム・イメージングを行い、上顎臼歯髄刺激に対する個々のニューロンの応答を観察した。その結果の概要を図 2 に示す。



IANX 群では興奮性、抑制いずれのニューロンも、上顎臼歯歯髄刺激が誘発する蛍光強度変化率が有意に上昇していた。また、応答するニューロンの割合も IANX 群で興奮性、抑制性いずれのニューロンタイプでも増大していた。興奮性ニューロンでは蛍光強度が上昇している時間が有意に延長していた。すなわち、IANX 群では、興奮性、抑制性ニューロンのいずれもが侵害刺激に対する応答性が増大していた。抑制性ニューロンの活動性が増大し、かつ刺激に応答しているニューロン割合が倍近く増加しているにも関わらず、興奮性ニューロンの活動性が増大していることから、抑制性ニューロンが興奮性ニューロンにかけている抑制の低下が考えられた。

(2) 温度感覚に関わる情報処理部位の検索

GCaMP6s マウスを用いたイメージング検討の結果

GCaMP6s はニューロン活動に伴う輝度変化率が非常に高くかつ持続的という特性を有するため、温度プローブによる速いと言いつい難い温度刺激に対する応答を記録するのに最適と予想し、マクロ的視野で光学計測法を行った。しかしながら、実際には大脳皮質の自発的な活動に伴う輝度変化が非常に大きく (Kozberg et al., 2016; 自発活動は成長とともに増加する) 光学計測で明らかな応答を検出するには至らなかった。一方で電気刺激のような応答のタイミングが揃う刺激に対しては GCaMP6s で応答が観察できたため、GCaMP6s を利用したマクロ的イメージングで検出できる応答には技術的な限界があると考えられた。

そこで、舌に電気刺激を行った際に島皮質で認められる領域を同定し、2 光子励起顕微鏡によるカルシウム・イメージングで温度変化に合わせて活動するニューロンを検索した。その結果、島皮質の尾側部で温度変化に同期してカルシウム蛍光の輝度が変化するニューロンが認められた (図 3)。しかしながら、絶対数としてわずかであり、この部位が温度中枢であるという確信には至らなかった。応答性を示すニューロンの数が少ない原因として、以下の可能性が考えられた。今回、2 光子励起顕微鏡によるカルシウム・イメージングは広い範囲を検索するために一定の深さ (表層から 200 μm) で行っており、記録していない深さのニューロンが実は重要な役割を果たしている可能性が否定できない。そこで、現在、深さ方向の幅を広げて記録するための手法を今年度からの研究課題として検討しているところである。一方で、温度情報処理に島皮質の寄与がそもそも小さい可能性も否定できず、これらの可能性を踏まえて今後さらに検討を重ねていきたい。

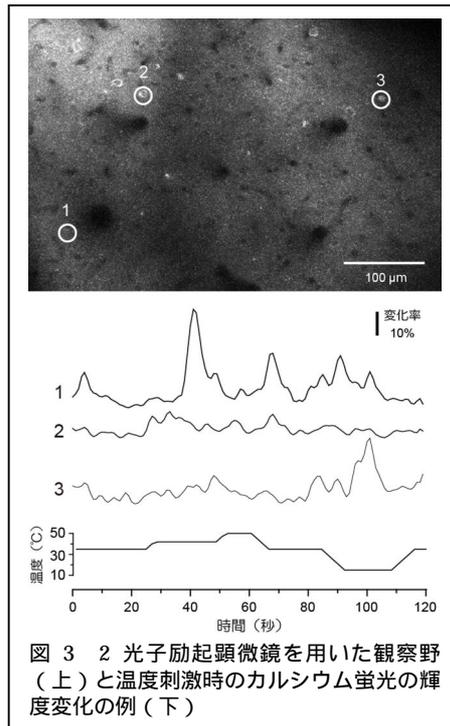


図 3 2 光子励起顕微鏡を用いた観察野 (上) と温度刺激時のカルシウム蛍光の輝度変化の例 (下)

ラットにおける膜電位感受性色素を用いた光学計測法の結果

上述のように温度プローブによるイメージングでは、温度情報を処理する脳部位を明確にすることは困難であった。鼻腔の空気の流れを受容する篩骨神経の活動性はその温度によって大きく影響を受けることが報告されている (Tsubone, 1989)。そこで圧搾した空気をラットの鼻腔内に吹き付けた時の皮質応答を、膜電位感受性色素を使った光学計測法によって記録した。また、冷感覚を増強する *l*-menthol を加えた空気刺激を鼻腔内に行い皮質応答の変化および島皮質に対する興奮伝播を検討した (図 4)。

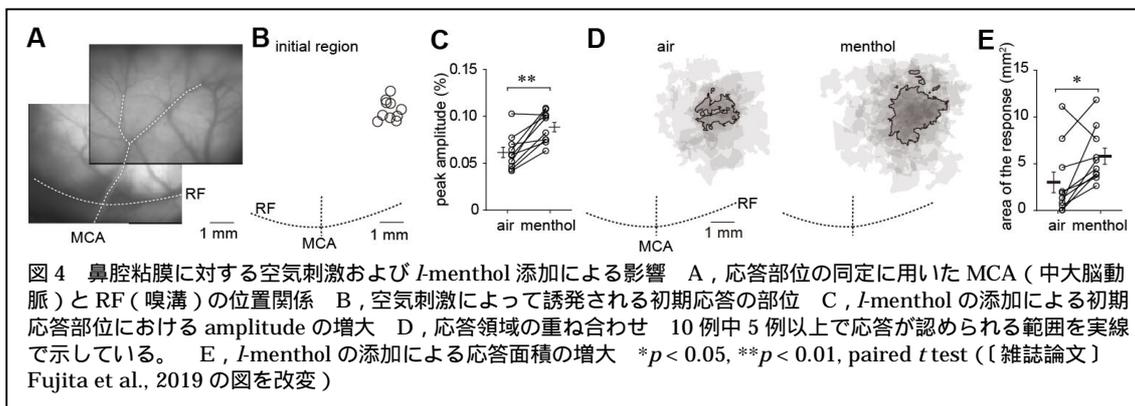


図 4 鼻腔粘膜に対する空気刺激および *l*-menthol 添加による影響 A, 応答部位の同定に用いた MCA (中大脳動脈) と RF (嗅溝) の位置関係 B, 空気刺激によって誘発される初期応答の部位 C, *l*-menthol の添加による初期応答部位における amplitude の増大 D, 応答領域の重ね合わせ 10 例中 5 例以上で応答が認められる範囲を実線で示している。 E, *l*-menthol の添加による応答面積の増大 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, paired t test (雑誌論文) Fujita et al., 2019 の図を改変)

鼻腔粘膜に対する空気刺激によって、島皮質の背側に位置する体性感覚野から応答が始まり、周囲に興奮伝播した。また、*l*-menthol を添加することによって、初期応答部位における amplitude の増大および応答領域の拡大が認められた。一部のラットでは腹側に存在する島皮質の尾側部分に向かう興奮伝播を認めた。これらの結果から、島皮質の関与は否定できないものの、体性感覚野における温度情報処理に着目した検討も、今後必要と考えられた。

(3)ニューロモデュレーション療法による疼痛緩和時の大脳皮質応答性

坐骨神経損傷モデルにおける疼痛評価として、後肢に対する刺激応答性を記録した(図5)。

その結果、ニューロモデュレーションを行った群では後肢刺激によって大脳皮質体性感覚野に誘発される応答の amplitude は減少傾向を示し、応答面積は減少する ($p < 0.05$) ことが示された。この結果

から、ニューロモデュレーション療法によって侵害刺激が誘発する大脳皮質の応答は低下することが示唆された。今後、大脳皮質に可塑的变化が誘発されていないか、また、顎顔面部の侵害受容情報は今回刺激した脊髄を介さないため、中継核に対して応用できないかについて検討する必要があると考えられる。

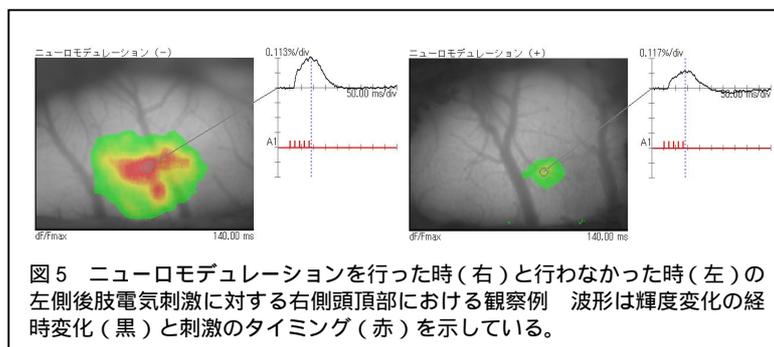


図5 ニューロモデュレーションを行った時(右)と行わなかった時(左)の左側後肢電気刺激に対する右側頭頂部における観察例 波形は輝度変化の経時変化(黒)と刺激のタイミング(赤)を示している。

<引用文献>

- Craig AD, Chen K, Bandy D, Reiman EM, Thermosensory activation of insular cortex, *Nat Neurosci*, 2000, 3, 184-190
- Guest S, Grabenhorst F, Essick G, Chen Y, Young M, McGlone F, de Araujo I, Rolls ET, Human cortical representation of oral temperature, *Physiol Behav*, 2007, 92, 975-984
- Kozberg MG, Ma Y, Shaik MA, Kim SH, Hillman EM, Rapid Postnatal Expansion of Neural Networks Occurs in an Environment of Altered Neurovascular and Neurometabolic Coupling, *J Neurosci*, 2016, 36, 6704-6717
- Olausson H, Charron J, Marchand S, Villemure C, Strigo IA, Bushnell MC, Feelings of warmth correlate with neural activity in right anterior insular cortex, *Neurosci Lett*, 2005, 389, 1-5
- Tsubone H, Nasal 'flow' receptors of the rat, *Respir Physiol*, 1989, 75, 51-64

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

- Fujita S, Yamamoto K, Kobayashi M. Trigeminal nerve transection-induced neuroplastic changes in the somatosensory and insular cortices in a rat ectopic pain model. *eNeuro*. 査読有, 2019, 6, ENEURO.0462-18.2019
doi: 10.1523/ENEURO.0462-18.2019
- Fujita S, Zama M, Kaneko K, Murayama S, Ohtani S, Usui M, Noma D, Tsuda H, Yamamoto K, Kobayashi M. Menthol-induced facilitation of cerebrocortical excitatory propagation induced by air puff stimulation of the nasal cavity in the rat: An optical imaging study. *Neurosci Lett*. 査読有, 2019, 696, 87-92
doi: 10.1016/j.neulet.2018.12.018
- Ohtani S, Fujita S, Hasegawa K, Tsuda H, Tonogi M, Kobayashi M. Relationship between the fluorescence intensity of rhodamine-labeled orexin A and the calcium responses in cortical neurons: An in vivo two-photon calcium imaging study. *J Pharmacol Sci*. 査読有, 2018, 138, 76-82
doi: 10.1016/j.jphs.2018.09.005
- Kaneko M, Fujita S, Shimizu N, Motoyoshi M, Kobayashi M. Experimental tooth movement temporally changes neural excitation and topographical map in rat somatosensory cortex. *Brain Res*. 査読有, 2018, 1698, 62-69
doi: 10.1016/j.brainres.2018.06.022
- Zama M, Hara Y, Fujita S, Kaneko T, Kobayashi M. Somatotopic organization and temporal characteristics of cerebrocortical excitation in response to nasal mucosa stimulation with and without an odor in the rat: An optical imaging study. *Neuroscience*. 査読有, 2018, 377, 77-86
doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.02.042
- Aoki R, Kato R, Fujita S, Shimada J, Koshikawa N, Kobayashi M. Phase-dependent activity of neurons in the rostral part of the thalamic reticular nucleus with saccharin intake in a cue-guided lever-manipulation task. *Brain Res*. 査読有, 2017, 1658, 42-50
doi: 10.1016/j.brainres.2017.01.013

〔学会発表〕(計 9 件)

藤田 智史, 山本 清文, 小林 真之, 異所性異常疼痛モデルラットにおける大脳皮質の侵害刺激受容応答の亢進. 第 92 回薬理学会年会, 2019

坐間 学, 小林 真之, 藤田 智史, 外木 守雄, メントールは鼻腔空気圧刺激による大脳皮質応答を増強する. 日本味と匂学会第 52 回大会, 2018

Satoshi Fujita, Kiyofumi Yamamoto, Masayuki Kobayashi, Enhancement of responses to upper molar pulp stimulation in somatosensory and insular cortices in an ectopic pain model of the rat. Oral Neuroscience 2018, 2018

藤田 智史, 坐間 学, 小林 真之, メントールは鼻腔空気圧刺激に対する大脳皮質応答を増強する. 第 60 回歯科基礎医学会学術大会, 2018

藤田 智史, 小林 真之, ローダミン標識オレキシンを用いた島皮質ニューロンの受容体数とカルシウム応答の相関の解析. 第 11 回三叉神経領域の感覚 運動統合機構研究会, 2017

Saori Ohtani, Satoshi Fujita, Masayuki Kobayashi, Koki Hasegawa, Morio Tonogi, Correlation between fluorescent intensity of rhodamine-labeled orexin and calcium responses of neurons in the insular cortex. The 11th Sleep Respiration Forum in Hawaii combined with Hawaii Sleep Society, 2017

大谷 紗織, 藤田 智史, 小林 真之, 長谷川 功紀, 外木 守雄, Rhodamine 標識オレキシンの蛍光強度とニューロンのカルシウム応答との相関. 第 16 回日本睡眠歯科学会総会・学術集会, 2017

Eri Horinuki, Satoshi Fujita, Noriyoshi Shimizu, Masayuki Kobayashi, Sequential changes in rat cortical excitation during orthodontic treatment. Neuroscience 2016, 2016

Satoshi Fujita, Risako Kato, Hiroko Nakamura, Mari Kaneko, Masayuki Kobayashi, Changes of neural activity responding to dental pulp stimulation in an inferior alveolar nerve transection model. International Congress on Orofacial Pain (ICOP), 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.dent.nihon-u.ac.jp/pharmacology/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 崔 翼龍

ローマ字氏名: CUI, Yelong

所属研究機関名: 国立研究開発法人理化学研究所

部局名: 生命機能科学研究センター

職名: ユニットリーダー

研究者番号 (8 桁): 60312229

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。